

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-509294

(43) 公表日 平成8年(1996)10月1日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I
G 0 1 N 33/53		8310-2 J	G 0 1 N 33/53
33/543	5 1 1	8310-2 J	33/543
			D
			5 1 1 H

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願平7-505505
(86) (22) 出願日 平成6年(1994)1月21日
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)1月26日
(86) 国際出願番号 PCT/EP94/00164
(87) 国際公開番号 WO95/04282
(87) 国際公開日 平成7年(1995)2月9日
(31) 優先権主張番号 PCT/EP93/02010
(32) 優先日 1993年7月28日
(33) 優先権主張国 世界知的所有権機構 (WO)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, FI, JP, NO, US

(71) 出願人 ベーリンガー マンハイム ゲーエムベー
ハー
ドイツ連邦共和国 ディー—68305 マン
ハイム, サンドホファー シュトラーセ
116番地
(72) 発明者 ネーザー, ヴァーナー
ドイツ連邦共和国 ディー—82362 ヴァ
イルハイム, アム マイスターアンガー
18番地
(72) 発明者 フーバー, エラスムス
ドイツ連邦共和国 ディー—86923 フィ
ニンク, エステー, ヴィリバルト 10番地
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するためのイムノアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドを認識する抗体を用いて試料中のコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するためのイムノアッセイに関する。このアッセイにおいて、試料を変性させることが望ましい。

【特許請求の範囲】

1. コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域に対応する合成直鎖状ペプチドを含む一つの結合パートナーを、その合成直鎖状ペプチドと結合可能な抗体および試料とともにインキュベートし、抗体と結合パートナーとの結合を適当な方法で測定する、試料中のコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するための競合イムノアッセイであって、試料を変性させることを特徴とするイムノアッセイ。

2. 合成直鎖状ペプチドがコラーゲンの非らせん状C-末端領域の配列に対応する、請求項1記載の方法。

3. 合成直鎖状ペプチドが5から25アミノ酸からなり、好ましくは8から20アミノ酸からなる、請求項1および2のいずれか1項記載の方法。

4. 合成ペプチドが配列番号1, 2, 3または4に対応する、請求項1から3のいずれか1項記載の方法。

5. 試料を抗体とインキュベートする前に変性させる、請求項1記載のイムノアッセイ。

6. T T A BまたはK C S Nを変性剤として使用する、請求項1記載のイムノアッセイ。

7. 試料を変性させ、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドを認識する少なくとも一つの抗体を用いて試料中のコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するためのイムノアッセイ。

8. タンパク質変性剤を第1の試薬中に含有し、これとは別に第2の試薬中に、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端

領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドを認識する抗体を含有する、試料中のコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するための組合せ試薬。

9. 試薬が、さらにコラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドを含有する、請求項8記載の組合せ試薬。

配列表

(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 9 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号: 1:

Xaa Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Xaa

1

5

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 16 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号: 2:

Ser Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln Pro Pro

1

5

10

Gln Glu Lys

15

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ：10 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号：3：

Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln

1

5

10

(2) 配列番号4の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：13 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号：4：

Cys Gly Ser Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln

1

5

10

【発明の詳細な説明】

コラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するための
イムノアッセイ

本発明は、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に相当する合成直鎖状ペプチドを認識する少なくとも一つの抗体を用いて試料中のコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するためのイムノアッセイに関する。ここにおいて試料は変性させることが望ましい。

コラーゲンは皮膚、軟骨、および骨の結合組織における重要な構造タンパク質である。それぞれ3本の鎖からなる11種のコラーゲンが知られている。それぞれのコラーゲンは $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、および $\alpha 3$ と称される1-3種類の異なる鎖からなる(E. Millerら、Methods in Enzymology 144より、Structural and Contractile Proteins, L. Cunningham編、Academic Press Inc. 1987, p.3-41)。特に骨や軟骨のような特定の組織の成熟コラーゲンに特徴的な性質は、ヒドロキシリシルピリジノリンまたはリシルピリジノリンによる隣接する線維の架橋形成である(D. Fujimotoら、J. Biochem. 83 (1978), 863-867; D. Eyreら、Ann. Rev. Biochem. 53 (1984), 717-748およびD. Eyre, Methods in Enzymology 144 (1987), 115-139)。こうした架橋をコラーゲンの特異的検出のための化学的なマーカーとして利用できる(Z. Gunja-Smithら、Biochem. J. 197 (1981), 759-762)。細胞外コラーゲンが分解した場合、ペプチド側鎖を有するヒドロキシリシルピ

リジノリン若しくはリシルピリジノリン誘導体が、またはリシル若しくはヒドロキシリシル残基を有する遊離のピリジノリン誘導体が、血液や尿といった体液中に移行する。したがって、体液におけるこうした化合物の検出は、例えば骨粗鬆症の場合および骨組織の腫瘍の結果として起こるような、細胞外コラーゲンの分解の指標となる。尿から単離できる適当な架橋コラーゲン断片を用いた免疫によって得られるモノクローナル抗体が、上記のようなペプチド側鎖を有するヒドロキシリシルピリジノリンまたはリシルピリジノリン誘導体の検出のために、WO 89/12824に記述された。また、WO 91/08478に記載された方法において、コラーゲ

ン検査は、天然の、すなわち *in vivo* で生じる、コラーゲンの架橋された分解産物に対する抗体を利用する。

天然起源から分離される上記のようなペプチドの欠点は、試験における抗原または結合パートナーを再現性よく生産するための信頼性のある起源が存在しないことである。天然起源から分離されたペプチドのもう一つの欠点は、感染性要素が混入する危険があることである。

例えば抗原のエピトープに相当するペプチドの化学合成によって、特定の抗原を得ることができる。このような目的で分子量約700-1500D程度の小さなペプチドを使用する場合には、免疫原としての作用を有する抗原を得るためにこのようなペプチドをさらに担体分子に結合させる必要がある。この過程で、担体分子との結合によってエピトープの構造が変化してはならない。したがって、担体分子との結合は予想されるエピトープ領域から十分離れたペプチド鎖の末端で予め行なっておく (Laboratory

Technics in Biochemistry and Molecular Biology, Synthetic Polypeptides as Antigens, R. H. Burdon および P. H. van Knippenberg編、Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 1988, 95-100ページ)。

架橋コラーゲンの天然分解産物に相当する特定の抗原を化学合成するに際して問題となるのは、化学合成が非常に複雑であるような架橋から生じるヒドロキシリシルピリジノリンまたはリシルピリジノリン構造である。

したがって、本発明の目的は、競合イムノアッセイにおいてコラーゲンまたはコラーゲン断片に対する抗体の特異的な結合パートナーとして使用するために、またコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するための競合イムノアッセイにおいて標準曲線または検量線を確立するための標準物質として使用するために、コラーゲンまたはコラーゲン断片に対する抗体を作成するための特定の抗原を提供することである。

試料中のコラーゲンまたはコラーゲン分解産物を検出するためには、架橋構造それ自体を、またはヒドロキシリシル若しくはリシル残基の架橋に由来する、いわゆる架橋ペプチドを検出する必要があると以前から考えられている。これは

、こうしたヒドロキシリシルピリジノリンまたはリシルピロジノリン構造がコラーゲンを特徴づけるためである。このような検出方法の例は、WO 89/12824, WO 91/08478, WO 89/04491およびWO 91/10141に記載される。

驚くべきことに、コラーゲンの非らせんの直鎖状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドを含有す

る特定の抗原、結合パートナー、または標準物質を使用するだけで上記の目的を達成できることが明らかになった。イムノアッセイにおける結合パートナーとして、標準物質として、または抗体生産における免疫原として、合成直鎖状ペプチドを使用する利点は、天然起源のペプチドとは対照的に、合成ペプチドは正確に定義された構造を再現して作成することができるという点である。さらに、このような短い合成ペプチドを使用するイムノアッセイは妨害を受けにくい。

このように、本発明は試料においてコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するための競合イムノアッセイに関するが、このイムノアッセイの特徴は、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドを含有する結合パートナーを、この合成直鎖状ペプチドと結合可能な抗体および試料とともにインキュベートし、抗体と結合パートナーとの結合を適当な方法で定量することである。

試料を変性させること、またはもっと適切に言うならば試料中に存在するコラーゲンまたはコラーゲン断片を変性させること、そしてそれによってエピトープが抗体結合を受け入れやすくすることが特に有益であることが判明した。最もよい方法は、試料を抗体とインキュベートする前に当業者に公知のタンパク質変性剤で前処理することである。試料と特異抗体との免疫学的反応の妨害を抑え、または完全に回避するために、変性させた試料を抗体とともにインキュベートする前に、さらに希釈することが望ましい。こうした目的のために当業者に知られているあらゆる試薬が変性剤として適している。2-6 Mの濃度のチオシアン酸カリ

ウム (KSCN) および0.5-2 Mの濃度の臭化テトラデシルトリエチルアン

モニウム (TTAB) が変性に特に適していることが判明した。

試料変性段階を導入することによって、未変性試料とはごくわずかししか結合しない抗体を利用することが可能になり、さらに言い換えれば、こうした抗体は変性試料とは非常によく結合する。したがって、このような変性段階を導入した結果、より多くの抗体がコラーゲンまたはコラーゲン断片の診断用検査に利用可能である。

さらに本発明は、コラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するための競合イムノアッセイにおいて標準曲線または検量線を確立するための標準物質に関し、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成ペプチドを含む抗原を含有するという特徴を有する。

さらに同様に、本発明は、コラーゲンまたはコラーゲン断片に対する抗体を生産するための、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に相当する合成直鎖状ペプチドを含有する抗原、およびこうした抗原を用いて生産される抗体に関する。

コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域のあらゆる連続的なアミノ酸配列が、合成直鎖状ペプチドとして適している。こうした領域は、Chouら、Nature 310, 337-340 (1984)、Clickら、Biochemistry 9, 4699-4706 (1970)、Morganら、J. Biol. Chem. 245, 5042-5048 (1970) およびBernardら、Biochemistry 22, 5213-5223 (1983) から公知である。5 から 25 アミノ酸

を含んでなるペプチドを使用することが望ましく、特に8から20アミノ酸を含むものが望ましい。この点について、上記配列が架橋領域を含んでなる必要はないが、架橋領域とオーバーラップすることも可能である。しかしながら、ヒドロキシリシルピリジノリンまたはリシルピリジノリン架橋が合成ペプチド中に存在することは決してない。コラーゲンのC-末端領域由来の合成ペプチドが特に適していることが判明したが、これはコラーゲンの非らせん状N-末端領域よりも非らせん状C-末端の方が長いためである。したがってN-末端領域よりもC-末端領域で、数多くの潜在的エピトープを利用することが可能である。コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖のC-末端領域に由来し、配列番号1, 2, 3, または4に示す配列

を有するペプチドが特に適している。

コラーゲンの分解産物の濃度は、骨溶解の程度に関し重要な診断上の目安となる。合成直鎖状ペプチドによって、コラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するための競合イムノアッセイを行なうことが可能となる。驚くべきことに、こうしたペプチドは、血漿、血清または尿といった天然試料中に存在するコラーゲン断片と、このようなコラーゲン断片に対する抗体に関して非常によく競合すること、したがってこうしたペプチドによって競合試験が可能となることが明らかになった。コラーゲンまたはコラーゲン分解産物に対する上記のような抗体は、例えばOrion Diagnostica Company FinlandからテロペプチドICTP [^{125}I] ラジオイムノアッセイキットとして市販されている。しかしながら、本発明にしたがって合成直鎖状ペプチドを用いて上記抗体を作成することが可能であり、望ましい。

競合イムノアッセイに用いるために、合成直鎖状ペプチドを固相に結合した結合パートナーとしてそのまま使用することができるが、第2の成分と結合させることも可能である。第2の成分との結合は、直鎖状ペプチドのN-末端およびC-末端アミノ酸を介して行なうことが望ましい。さらに、ペプチドと第2の成分との間にスペーサーを挿入することができる。第2の成分は、例えば、ペプチドを間接的に固相に結合させるために機能することができる。このような例は当業者に公知である。ウシ血清アルブミンにペプチドを結合させ、その結合産物を吸着作用によってプラスチック管のような固相に結合させることが望ましい。また、ペプチドをビオチンに共有結合させることも可能である。次に、予め固相に結合したアビジンまたはストレプトアビジンと結合させることによって固相に付着させる。例えば、2以上のペプチドがアルブミン、イムノグロブリン、 β -ガラクトシダーゼ、ポリリシンのようなポリマー、またはEP-A-0 545 350に記載されたようなデキストラン分子、あるいはラテックスのような粒子と結合するような競合比濁阻止イムノアッセイ (T I N I A) において、第2の成分は2以上のペプチドの担体としても機能することができる。担体分子当り30から40のペプチド分子を結合することが望ましい。ペプチドを、標識を表す成分と結合する

こともできる。これらすべての検査変法の例は当業者に公知である。

検査手順において、抗体を試料および合成直鎖状ペプチドを含有する結合パートナーと同時にまたは順次続けてインキュベートすることができる。次に、結合した抗体または非結合抗体の量を常法により定量する。例えば、使用する抗体それ自体を標識し

てもよく、このような標識は結合または非結合抗体の測定標準として直接的に機能する。例えば、上記抗体のFc部分に対するような、結合または非結合抗体に対する第2の標識抗体を使用することもできる。TINIAのような凝集試験、またはFPIA（蛍光偏光イムノアッセイ）（W. Dandlikerら、J. Exp. Med. 122 (1965), 1029）、EMIT（エンザイムマルチプライドイムノアッセイ）（Gunzerら、KontakteIII (1980), 3-11）およびCEDIA法（Hendersonら、Clinical Chemistry 32 (1986), 1637-1641）が、例えば、結合または非結合抗体の量を測定するための競合試験の変法として機能することも可能である。本発明のペプチドが抗体との結合について試料と競合する特定の結合パートナーとして使用するのに特に適していることが判明した。配列番号1, 2, 3または4に示す配列を有する合成直鎖状ペプチドが特に望ましい。

どの程度の抗体が結合パートナーと結合したかを定量した後、このような抗体の結合度合は試料中の抗原量の指標となるので、同様に処理された標準物質と比較することによって、常法により試料中の抗原の正確な量を定量することができる。

天然材料から単離されたコラーゲン分解産物を標準物質として使用することは可能である。しかしながら、これらはある一定の内在的な可変性によって特徴づけられる。本発明の合成直鎖状ペプチドを含有する抗原の方が、標準物質として適していると判明した。この場合、標準物質の抗原は、上記ペプチドのみから構成されてもよく、または例えばペプチドの水溶性を高めるために機能する適当な担体と結合した上記ペプチドからなってもよい。

ペプチドおよび担体を含んでなる標準物質を作成するために、コラーゲンの非ら

せん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する直鎖状ペプチドを合成し、適当な結合法によって、そのN-末端またはC-末端アミノ酸を介して担体分子と結合させる。担体分子当り1または2以上のペプチドを結合させることができる。結合はスペーサーを介して行なうことも選択できる。凝集試験のようなある一定の目的のために、異なる配列を有する2以上の本発明のペプチドを担体分子に結合させることは、特に、本発明の抗原を使って作成されずしたがって通常2以上のエピトープを認識するポリクローナル抗体を試験に使用する場合には、有益であると考えられる。

コラーゲン分解産物に対する既知の抗体を競合アッセイにおいて抗体として使用することができる。本発明の直鎖状合成ペプチドを含有する抗原を用いて得られた抗体は、特に適している。

免疫のために、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の1または2以上の配列に対応する直鎖状合成ペプチドを、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、またはエデスチンのような適当な担体タンパク質に結合することが望ましい。

このような抗原または免疫原を作成するために、まず直鎖状ペプチドを常法により化学的に合成する。次に、マレインイミドヘキサ酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを用いて、合成ペプチドをN-末端アミノ基を介して前記の担体タンパク質に結合させる。驚くべきことに、配列番号1, 2, 3または4に示す配列を有する合成直鎖状ペプチドは競合試験法に適した抗体の

生産に特に適していることが明らかになった。

コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に相当する合成直鎖状ペプチドを含有する本発明の抗原によって、本発明のペプチドのみならず、体液中に存在するコラーゲンの分解産物も認識する抗体を得ることが可能となる。

したがって、本発明はさらに、本発明の抗原によって免疫し、そして免疫した動物の血清から求める抗体を公知の方法により単離することによる、コラーゲンまたはコラーゲン断片に対する抗体の生産方法に関する。求める抗体は、担体

タンパク質、特にセファロースに結合した配列番号1, 2, 3または4に示す配列を有するペプチドに対する免疫吸着によって単離することが望ましい。

本発明の望ましい主題は、本発明の抗原により免疫し、免疫した動物の脾細胞を不死化させ、求める抗体を産生する不死化脾細胞をクローニングし、およびクローン化細胞から、またはクローン化細胞の培養上清から抗体を単離することによって、コラーゲンまたはコラーゲン断片に対する単クローン性抗体を生産する方法である。

通常免疫に使用される動物により、免疫を行なう。マウスまたはウサギの使用が望ましい。例えばハイブリドーマ法 (KöhlerおよびMilstein, Nature 256 (1975), 495-497) のような当業者に公知の方法によって、またはエプスタインバーバル (Epstein-Barr) ウイルスによるトランスフォーメーション (EBVトランスフォーメーション) によって、免疫した動物の脾細胞を不死化する。求める抗体を生産する不死化細胞を検出するために、一

般的なイムノアッセイとして培養上清試料を免疫に使用した本発明の抗原とともにインキュベートし、抗体がこの抗原と結合するかどうか調べる。

さらに本発明は、本発明の方法によって得られるポリクローナルおよびモノクローナル抗体に関する。

上記のようなポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、免疫のために使用した本発明のハプテンと反応するのみならず、コラーゲンとも、体液中に見いだされるコラーゲンの自然分解産物ともよく反応する。試料中に存在するコラーゲンまたはその断片は変性させることが望ましく、それによってほとんどの場合、本発明の抗体の結合が相当に向上する。

したがって、本発明の抗体をコラーゲンまたはコラーゲン断片の定量のための検査手順において使用することができる。

それゆえ本発明はさらに、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドを認識する少なくとも一つの抗体を用いて試料中のコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するためのイムノアッセイであって、試料を変性させることを特徴とするイムノアッセイに関する。本発明

の直鎖状ペプチドをさらに使用する上記の競合イムノアッセイが最も適していることが判明した。本発明の抗体の使用は決して競合イムノアッセイに限定されない。抗体はサンドイッチイムノアッセイのような他の検査形式にも使用することができる。現時点の技術水準で得られる抗体を、例えば上記のイムノアッセイにおける第2の抗体として使用することができる。これら二つの抗体が同一の結合部位について相互に競合しないよう注意することだけ

は必要である。

さらに本発明は、抗体を組織試料とともにインキュベートし、この抗体に結合するコラーゲン分解産物を定量することによって骨溶解を定量するための、本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体の使用に関する。

本発明はさらに、第1の試薬中にはタンパク質変性剤を含有し、これとは別に第2の試薬中にはコラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドを認識する抗体を含有する、試料中のコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するための組合せ試薬に関する。試薬は水性で、好ましくは緩衝化された溶液の状態（この場合、免疫学的反応を妨害しない当業者に公知のあらゆる一般的な緩衝液を上記の緩衝液として使用することができる）、または乾燥した、好ましくは凍結乾燥した混合物の状態（水のような適当な溶媒を添加することによってこの混合物を再構成することができる）で存在する。

また、妨害を減らす物質、タンパク質または界面活性剤といった他の一般的な検査添加剤も含有することができる。試薬の組合せはさらに、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に対応する合成直鎖状ペプチドも抗体の結合パートナーとして含有する。合成直鎖状ペプチドは担体と直接結合してもよく、または固相との結合を仲介する第2の成分と結合してもよい。こうしたペプチドは標識を表す成分と結合することも可能である。

さらに、標準曲線または検量線を確立するための標準物質が、コラーゲンの非らせん状C-末端またはN-末端領域の配列に

対応する合成ペプチドを含む抗原を含有する第3の試薬中に存在してもよい。

本発明は配列表とともに以下の実施例によってより詳細に説明される。

配列番号1は、9アミノ酸からなる本発明のペプチドの配列を示し、ここで、Xaaは不定のアミノ酸を表す。

配列番号2は、16アミノ酸からなる本発明のペプチドの配列を示す。

配列番号3は、10アミノ酸からなる本発明のペプチドの配列を示す。

配列番号4は、13アミノ酸からなる本発明のペプチドの配列を示す。

実施例1

ペプチド合成

配列表の配列番号2および3に示すコラーゲンアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドを、フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 固相ペプチド合成によって、a) Labortec SP 640 ペプチド合成機、またはb) Zinsser 分析用 SMPS 350 ペプチド合成機で合成する。

a) アセチル-Ser-Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-アミド (配列番号 2) の生産

以下のFmocアミノ酸誘導体のそれぞれを4.0当量ずつ、記載の順序で使用する：

Lys 第三ブチルオキシカルボニル保護基を有する

Glu 第三ブチルエステル保護基を有する

Gln 側鎖保護基無し

Pro 側鎖保護基無し

Pro 側鎖保護基無し

Gln 側鎖保護基無し

Pro 側鎖保護基無し

Leu 側鎖保護基無し

Phe 側鎖保護基無し

Ser 第三ブチルエーテル保護基を有する

Phe 側鎖保護基無し

Asp 第三ブチルエステル保護基を有する

Phe 側鎖保護基無し

Gly 側鎖保護基無し

Ala 側鎖保護基無し

アセチル 無水酢酸

アミノ酸またはアミノ酸誘導体をN-メチルピロリドンに溶解する。

0.87 mmol/gの保持量を有する3gの4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)-フェノキシ樹脂上で (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107) ペプチドを合成する (JACS 95 (1973), 1328)。Fmocアミノ酸誘導体に関して4.4当量のジシクロヘキシルカルボジイミドおよび4.8当量のN-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いて、反応溶媒としてジメチルホルムアミド中で、60分間カップリング反応を行なう。カップリング収率はイソプロパノールで洗浄した合成用樹脂

上で、Kaiserテスト (Anal. Biochem. 34 (1970), 595) によってモニターする。これが完全な変換を示さない場合には、上記の条件で再カップリングさせて変換を完了させる。合成の各段階の後で、ジメチルホルムアミド中20%のピペリジンを用いて20分以内にFmoc基を切断する。樹脂の保持量は、各回のピペリジン処理後、遊離されたフルベン基のUV吸収によって定量される。合成後、保持量はなお0.68 mmol/gである。

ペプチドを合成用樹脂から遊離させ、酸に不安定な保護基を80 mlのトリフロロ酢酸、5 mlのエタンジチオール、2.5 gのフェノール、2.5 mlのm-クレゾールおよび5 mlの水を用いて室温で60分以内に切断する。

次に、反応溶液を減圧濃縮する。残留分をジイソプロピルエーテルにとり、0.5-2時間激しく攪拌した後、濾過する。次にこれを、溶出剤として0.5%酢酸を用いてSephadex G15でのゲル濾過クロマトグラフィーによって予備的に精製する。続いて、得られた粗精製標品を濾過し、100%緩衝液A（水、0.1%トリフロロ酢酸）から100%緩衝液B（60%アセトニトリル、40%水、0.1%トリフロロ酢酸）への濃度勾配を用いてNucleosil RP18（カラム40 mm x 250 mm 300 Å、5 μm）上で調製用HPLCによっ

て120分以内に単離する。溶出された標品を高速原子衝撃質量分析 (FAB-MS) によって同定する。

b) Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln (配列番号 3) の合成

0.47 mmol/g の保持量を有する 30 mg の 4 - (2

, 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)-フェノキシ樹脂 SA 5030 (Advanced Chemtech Company製) 上で、ペプチドを合成する。下記のFmocアミノ酸誘導体のそれぞれ140 μ molを、2回、それぞれの場合についてジメチルホルムアミドDMF中140 μ molの1-ヒドロキシベンゾトリアゾールおよびDMF中10 μ molのN,N-ジイソプロピルカルボジイミドとともに、構築されるべき固相-結合ペプチドに結合させた：

Glu	トリチル保護基を有する
Ser	第三ブチル保護基を有する
Asp	第三ブチル保護基を有する
Pro	側鎖保護基無し
Leu	側鎖保護基無し
Phe	側鎖保護基無し
Gly	側鎖保護基無し
Ala	側鎖保護基無し

カップリング時間は30分および40分とした。切断時間は20分とし、50%ピペリジンDMF溶液を用いて行なった。洗浄段階は、DMFを用いて各反応段階後に8回行なった。

予め濾過して溶媒を除去しジクロロメタンおよびメタノールで洗浄しておいた樹脂を、90%トリフロロ酢酸、3%チオアニソール、3%エタンジチオールおよび3%チオクレゾールを含む1mlの溶液を用いて20分および140分処理することによってペプチドを遊離させた。集めた濾液に15mlの冷ジイソプロピルエーテルを添加することによって産物を沈澱させ、濾過によって単離した。残渣を50%酢酸に溶解し、凍結乾燥した。HP

LCによれば79%の純度で8mgの白色凍結乾燥標品が得られた。FAB質量分析によって同一性を確認した。

配列番号 4 のCys-Gly-Ser-Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Glnの配列を有するペプチドも、同様の方法で合成した。

実施例 2

ペプチドの活性化

マレインイミドヘキサノイル-N-ヒドロキシスクシンイミド (MHS) によるアシル化によって、実施例 1 a) にしたがって合成されたペプチドを活性化する。このために、0.1mmolのペプチドを20mlの0.1mol/lリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、0.1mmol MHSを6mlジオキサンに溶解した溶液と混合し、20℃で20分間攪拌する。次に、pH値を氷酢酸でpH 4に調整し、反応混合物をただちに凍結乾燥する。凍結乾燥標品を5mlの水に溶解し、100%A (水、0.1%トリフルオロ酢酸) から100%B (99.9%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸) への溶離勾配を用い

て、Waters Delta-Pak® C18カラム (100 Å、15 μ m

50 x 300 mm) で、調整用HPLCによって精製する。

実施例 3

活性化ペプチドを担体タンパク質に結合させることによる免疫原の作成

活性化ペプチドをキーホールリンペットヘモシアニン (KL

H)、ウシ血清アルブミン (BSA)、および β -ガラクトシダーゼ (β Gal) とカップリングさせることについて述べる。実施例 2 にしたがってMHSで活性化されたペプチドをカップリングするために、担体タンパク質は遊離のSH基を有する必要がある。 β -Galは自然の状態ですべてこれを有しているため、さらに前処理する必要はない。KLHおよびBSAの場合には、リジン残基の ϵ -アミノ側鎖のNH₂基を、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオプロピオン酸 (SATP) で処理して誘導体化し、これによってSH基に変換する。

こうして、天然型と比較してSH基の増加した担体タンパク質が得られる。

このために、500 mlの0.1 mol/lリン酸カリウム緩衝液(pH 8.5)に溶解した1.39 gのKLHに、113.51 mgのSATP(10 mlジオキサンに溶解)を20分間で滴下して添加する。20℃で30分間攪拌した後、反応溶液のpH値を0.1 mol/l水酸化ナトリウムを用いてpH 8.5に再調整し、さらに24時間攪拌する。次に、溶液をAmiconセル(メンブランYM10)によって100 mlに濃縮し、3 x 24時間、各回につき、3 lの0.1 mol/lリン酸カリウム緩衝液(pH 8.5)/0.05 mol/l塩化ナトリウムに対して透析した後、凍結乾燥する。

S-アセチル保護基を切断するために、481 mgのKLH-SATP凍結乾燥標品を20 mlの0.1 mol/lリン酸カリウム緩衝液(pH 8.5)/0.05 mol/l塩化ナトリウムに溶解し、直前に調製した0.5 mlの1 mol/lヒドロキシルアミン溶液と混合し、20℃で90分間攪拌する。

実施例2にしたがって得られた7.23 molの活性化ペプチド(4 ml水に溶解)を誘導体化した担体タンパク質に加え、20℃で20時間攪拌する。次に、濁りの生じた溶液を2回、1 lの0.1 mol/lリン酸カリウム緩衝液(pH 8.5)/0.05 mol/l塩化ナトリウムに対して透析する。透析物を遠心分離し、透明な上清をデカントして、凍結乾燥する。

実施例4

直鎖状コラーゲン断片に対するポリクローナル抗体の作成

実施例3で得られた免疫原を用いて、5頭のヒツジをそれぞれ公知の方法により免疫した。この免疫原は、I型コラーゲンの α 鎖の配列のうちアミノ酸番号892から907に対応する、配列番号2に示す配列を有するペプチドを含有していた。KLHまたは β -ガラクトシダーゼは、担体タンパク質として機能した。フロイント完全アジュバントに溶解した免疫原を用いて動物を一ヶ月間隔で免疫した。用量は動物個体当たり、免疫処置当たり500 μ gとした。初回免疫から4ヵ月後に血液試料を採取し、得られた抗体のコラーゲン断片との反応について調べた。

抗血清のコラーゲン断片との反応を検出するためのELISA 以下の材料お

よび試薬を使用した：

マイクロタイタープレートMaxisorp F96, Nunc Company

コーティング緩衝液：50 mM炭酸ナトリウム (pH 9.6)

0.1% Na₂S₂O₃

インキュベーション緩衝液：10 mMリン酸ナトリウム (pH

7.4)

0.1% Tween 20

0.9% NaCl

1% ウシ血清アルブミン

基質溶液：ABTS®、Boehringer Mannheim GmbH, カタログ番号 857424

シグナルを増加させるために2 mg/ml バニリンを添加した。

洗浄溶液：0.1% Tween 20

0.9% NaCl

タイタープレートの各ウェルに、コーティング緩衝液中に10 µg/mlのコラーゲン断片を含有する溶液100 µlを容れた。コラーゲン断片は、骨起源のヒトコラーゲンをEP-A-0 505 210の説明にしたがってプロテアーゼ消化することによって調製した。振盪しながら室温で1時間インキュベートした後、洗浄溶液で3回洗浄した。

抗血清を1:4000にインキュベーション緩衝液で希釈し、100 µlずつをマイクロタイタープレートのウェル中で振盪しながら室温で1時間インキュベートした。次に、ウェルを洗浄溶液で3回洗浄した。

ヒツジ IgG のFc部分に対するウサギ抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼとの複合体をインキュベーション緩衝液で12.5 mU/mlの濃度に希釈し、マイクロタイタープレートの各ウェルに100 µl上記を容れる。振盪しながら室温で1時間インキュベートした後、タイタープレートを洗浄溶液で3回洗浄する

。

100 μ l の基質溶液を添加して、透明な色が生じるまでインキュベートする（10-60分）。405および492nmでの測定の違いとして、吸光度を測定する。

ほとんどの動物の血清が、固相上でコラーゲン断片との強い反応を示した。免疫しなかった動物の血清は同一条件下で弱い測定シグナルしか示さなかった。結果を表1に示す。

表1

β -ガラクトシダーゼ		KLH	
動物番号	吸光度	動物番号	吸光度
1	1.05	1	1.16
2	1.18	2	2.62
3	1.49	3	1.28
4	0.48	4	1.42
5	> 2.70	5	1.81

実施例3の免疫原によって、同様の方法によりマウスを免疫し、抗血清を得た。三つの抗血清223/20、241/13、および242/2が特に適していた。抗血清223/20は、KLHに結合した配列番号4に対応するデカペプチドを用いて免疫されたマウスから得られた。

抗血清241/13は、KLHに結合した16アミノ酸の長さの配列番号2に対応するペプチドを用いて免疫されたマウス

から得られた。

抗血清242/2は、 β Galに結合した16アミノ酸の長さの配列番号2に対応するペプチドを用いて免疫されたマウスから得られた。

実施例5

競合試験による体液中のコラーゲンおよびその分解産物の定量

96穴マイクロタイタープレートのウェルを、EP-A-0 344 578のストレプトア

ビジン (PBS 中 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を $100 \mu\text{l}$) を用いて 4°C で一晚コーティングし、なお遊離の非特異的結合サイトを $300 \mu\text{l}$ の BSA (ウシ血清アルブミン、 $10 \text{mg}/\text{ml}$) とともに室温で2時間インキュベートすることによってブロックする。

実施例 1 b) にしたがって調製された、配列番号 3 に示す配列を有するデカペプチドを、D-ビオチニル- ϵ -アミドカプロン酸-N-スクシンイミドエステル (Boehringer Mannheim, カタログ番号 1008960) を用い、製造業者の説明書にしたがって、そのアミノ末端でビオチニル化する。ビオチニル化したペプチドを $10 \text{ng}/\text{ml}$ の濃度で PBS、0.05% Tween 20、1% BSA に溶解し、ウェル当り $10 \mu\text{l}$ を1時間インキュベートすることによって、ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタープレートに結合させる。次に、未結合のペプチドを PBS、0.05% Tween 20 で3回洗浄することによって除去する。

検査すべき試料 (血清、血漿または標準物) の $150 \mu\text{l}$ を

、それぞれ、実施例 4 で得られた本発明の抗体 $150 \mu\text{l}$ とともに 37°C で2時間 (または 4°C で一晚) インキュベートする。この混合物 $100 \mu\text{l}$ をそれぞれ、マイクロタイタープレートのウェル内の結合したデカペプチドに添加し、 37°C で60分間インキュベートする。試料とともにインキュベートした後、なお結合していない抗血清の抗体過剰分だけが、固定化されたデカペプチドと結合することができる。

：PBS/0.05% Tween 20 で3回洗浄後、結合した抗体を次にウサギ抗-ヒツジ IgG-POD 複合体 (Boehringer Mannheim GmbH) および ABTS® ($1 \text{mg}/\text{ml}$) とともにインキュベートすることによって検出する。

164 人の患者の血清を本発明の試験を用いて測定した (MTP 競合試験)。結果は、ラジオイムノアッセイ (RIA) で定量されたデータと関連性があった。この RIA ICTP (テロペプチド ICTP [^{125}I]、Orion Diagnostica Company, Finland より入手) は、酵素的消化および生化学的方法によって調

製、単離された、架橋されたコラーゲン断片に基づいている。第1図から、本発明の方法が結果的にRIA値とよく相関する測定値を与えることが理解され、このことは本発明の方法が臨床的に相応するデータを与えることを意味する。0.959の相関係数が決定された。

実施例6

コラーゲン由来のC-末端ペプチドの定量に関する変性剤の影響

配列番号 3に対応するビオチニル化されたデカペプチドを

、実施例5に記載のようにストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタープレートに結合させる。

別に、Risteli (1993) にしたがって調製されたコラーゲンの断片であるC-末端テロペプチド (CTX) をマイクロタイタープレート (Nunc, Maxisorb) の表面に吸着させた。このために、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のCTXを含有する溶液 $100\mu\text{l}$ をマイクロタイタープレートの各ウェル内で 4°C で一晩インキュベートする。遊離の非特異的結合サイトを $300\mu\text{l}$ ウシ血清アルブミン ($10\text{mg}/\text{ml}$ PBS) とともに室温で2時間インキュベートすることによってブロックする。

CTX溶液を試料として使用する。この試料をPBS溶液のみ (対照)、3Mチオシアン酸カリウム (KSCN) を含有するPBS、または1%臭化テトラデシルトリエチルアンモニウム (TTAB) を含有する溶液のいずれかで前処理する。等量のCTX溶液および緩衝液溶液を混合し、1時間インキュベートする。

次に、混合物を0.05% Tween 20® 含有PBS溶液で1:10に希釈したが、これは変性剤を希釈しないと抗体の免疫反応性に影響する可能性があるためである。

このようにして前処理された試料 $100\mu\text{l}$ を、デカペプチドまたはCTXのいずれか一方で上記のようにコーティングされたマイクロタイタープレート中で、室温で1時間、マウスポリクローナル抗体の溶液 $100\mu\text{l}$ とともにインキュベートする。結合

しない抗体を0.05% Tween 20® 含有PBSで3回洗浄するこ

とによって除去した。ヒツジ抗マウスF (a b) - P O D 複合体 (Boehringer Mannheim GmbH, カタログ番号 1 1 7 2 8 0 8)

および A B T S ® (1 m g / m l) を用いて、結合した抗体を検

出した。

実施例 4 に記載したマウス 2 2 3 / 2 0、2 4 1 / 1 3 および 2 4 2 / 2 から得られた抗血清を、使用前に 0. 0 5 % Tween 20 ® 含有 P B S で 1 : 2 0 0 0 に希釈して抗血清として使用した。

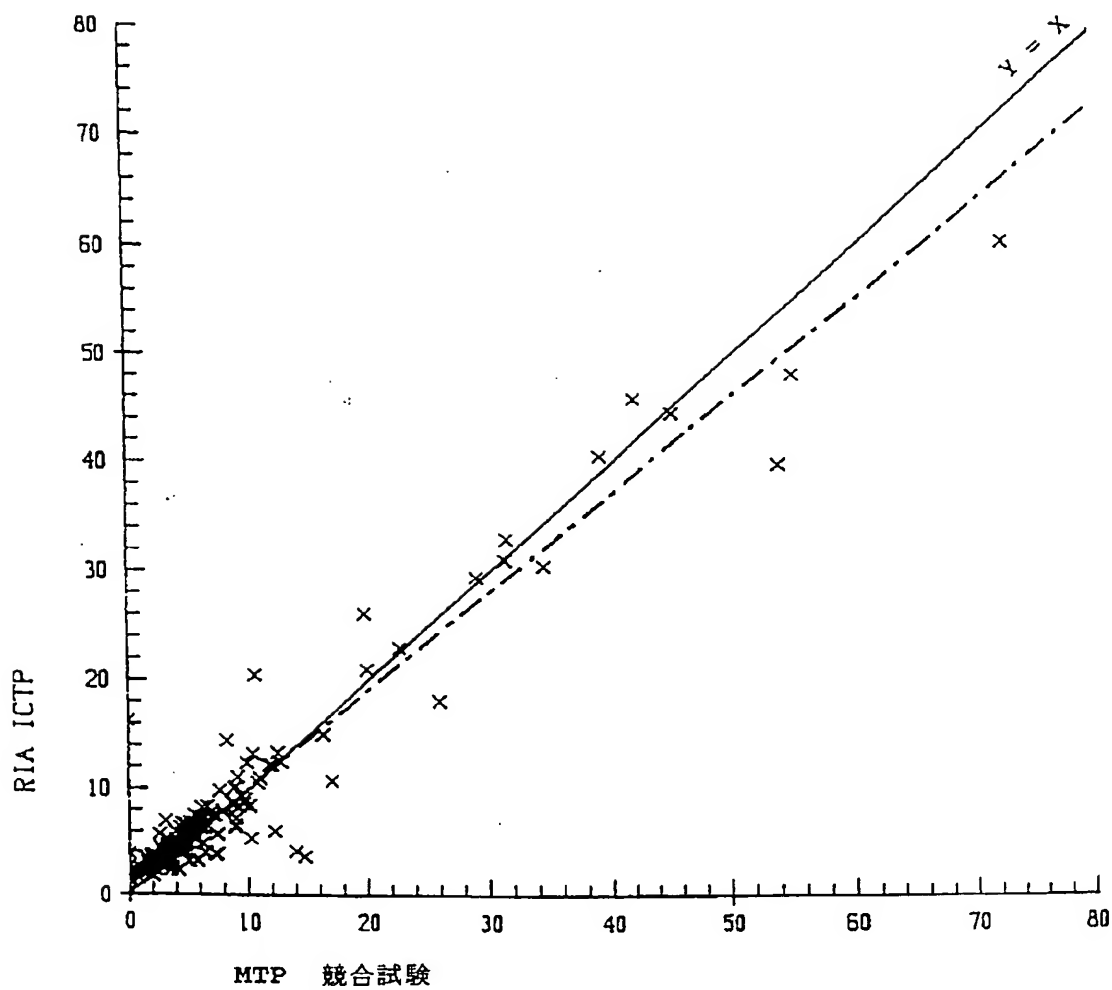
結果を表 2 にまとめて示す (測定吸光度)。変性剤のない P B S 中の C T X はマウス血清 2 4 2 / 2 と有意な競合を示すのみである。変性剤 K S C N および T T A B の使用は、あらゆる場合に、たとえ変性剤なしでは有意な競合を示さなかった抗血清との競合についても、激しい競合の増加をもたらす。

表 2

試料前処理	抗血清 223/20	抗血清 241/13	抗血清 242/2
対照 P B S 未変性 C T X	1.314 1.125	0.502 0.370	0.563 0.283
対照 KCSN CTX + KSCN	1.202 0.461	0.443 0.174	0.562 0.259
対照 TTAB CTX + TTAB	0.873 0.107	0.217 0.090	0.471 0.244

【図1】

Fig. 1/1



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 94/00164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/68 C07K7/06 C07K7/08 C12P21/08 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 298 210 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 11 January 1989 see the whole document ---	1,3,7-9
X	WO,A,90 08195 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 26 July 1990 see the whole document ---	1,3,7-9
Y	---	2
Y	EP,A,0 465 104 (ORION-YHTYMA OY) 8 January 1992 see the whole document ---	2
A	---	1,3-11
Y	WO,A,91 09113 (REGENTS OF THE BOARD OF MINNESOTA) 27 June 1991 see page 1 - page 3 ---	2
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "U" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "a" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 1994

Date of mailing of the international search report

18.05.94

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 581 & Patentaan 2
NL - 2210 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 451 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hitchen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/EP 94/00164

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,O 339 443 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 2 November 1989 see abstract; claims ---	1,7-9
A	BIOCHEMISTRY vol. 22, 1983 pages 5213 - 5223 M.P.BERNARD ET AL. 'Nucleotide Sequences of Complementary Deoxyribonucleic Acids for the Pro alpha 1 Chain of Human Type I Procollagen. Statistical Evaluation of Structures That Are Conserved during Evolution.' cited in the application see page 5213 - page 5218 ---	1,4
A	BIOCHEMISTRY vol. 9, no. 24, 1970 pages 4699 - 4706 E.M.CLICK ET AL. 'Isolation and Characterization of the Cyanogen Bromide Peptides from the alpha 1 and alpha 2 Chains of Human Skin Collagen.' cited in the application see abstract ---	1,4
A	EP,A,O 505 210 (ORION-YHTYMA OY) 23 September 1992 see the whole document ---	1,2,4
P,X	WO,A,93 15107 (D.J.BAYLINK ET AL.) 5 August 1993 see the whole document ---	1,7-9
A	EP,A,O 316 306 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 17 May 1989 Ziehe die Zusammenfassung; Seite 4, Zeilen 22-43; Seite 6, Zeile 54- Seite 7, Zeile 28. ---	1,5-8
A	EP,A,O 121 303 (NOCTECH LIMITED) 10 October 1984 see page 6, line 28 - line 36; claims ---	1,5-8
E	DE,A,42 25 038 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 3 February 1994 see the whole document -----	1-4,7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter- national Application No

PCT/EP 94/00164

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0298210	11-01-89	DE-A- 3714634 DE-D- 3886109 JP-A- 63292061	17-11-88 20-01-94 29-11-88
WO-A-9008195	26-07-90	NONE	
EP-A-0465104	08-01-92	GB-A- 2245568 JP-A- 4261199	08-01-92 17-09-92
WO-A-9109113	27-06-91	US-A- 5081031	14-01-92
EP-A-0339443	02-11-89	JP-A- 2013396	17-01-90
EP-A-0505210	23-09-92	NONE	
WO-A-9315107	05-08-93	NONE	
EP-A-0316306	17-05-89	US-A- 4647654 US-A- 4658022 US-A- 4727036 AU-A- 3375589 AU-B- 594651 AU-A- 4926085 DE-A- 3586679 DE-D- 3587687 DE-T- 3587687 EP-A, B 0185870 JP-A- 61172064	03-03-87 14-04-87 23-02-88 17-08-89 15-03-90 08-05-86 29-10-92 27-01-94 07-04-94 02-07-86 02-08-86
EP-A-0121303	10-10-84	AU-B- 572117 AU-A- 2453384 CA-A- 1233117 CA-C- 1239581 JP-A- 59168372 US-A- 4619896	05-05-88 11-10-84 23-02-88 26-07-88 22-09-84 28-10-86
DE-A-4225038	03-02-94	WO-A- 9403813	17-02-94

フロントページの続き

- (72)発明者 ザイデル, クリストフ
ドイツ連邦共和国 ディー—82362 ヴァ
イルハイム, シュタインシュトラーセ 6
ビー番地
- (72)発明者 エシッグ, ウルリッヒ
ドイツ連邦共和国 ディー—82152 ブラ
ネッグ, ヨセフ—フォン—ヒルシューシュ
トラーセ 51番地